

ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ ALCOOL DÉSHYDROGÉNASE CHEZ LES PLEUROTÉS DES OMBELLIFÈRES. II — ÉTUDE QUANTATIVE¹

par Prosper BALOUNGA*

RÉSUMÉ. — L'activité alcool déshydrogénase et la croissance mycélienne de deux souches homocaryotiques et d'une souche dicaryotique de *Pleurotus eryngii* sont suivies, premièrement après introduction de différentes concentrations d'éthanol dans le milieu de culture et deux semaines de croissance, deuxièmement en fonction du temps, sur milieu témoin et sur milieu éthanol 2 %. L'activité A.D.H. n'est pas uniforme dans le temps et les pics d'activité maximale se situent toujours avant la fin de la phase de croissance exponentielle. Le dicaryon présente un comportement fondamentalement différent de celui de ses deux homocaryons constitutifs mais ceux-ci expriment leurs propres caractéristiques.

SUMMARY. — Alcohol dehydrogenase activity and mycelial growth are studied on two homokaryotic and ■ dikaryotic isolates from *Pleurotus eryngii*. First, different ethanol concentrations ■■ introduced in the cultural medium and analysis are performed after two weeks. Secondly, mycelia are grown separately on reference and 2 % ethanol cultural media and analysed at different ages. A.D.H. activity is not uniform in time and maxima occur always before the end of exponential growth. The dikaryon exhibits a fundamentally different behaviour than its two constituting homokaryons that exhibit their own characteristics.

MOTS CLÉS : *Pleurotus eryngii*, Basidiomycètes, homocaryons, dicaryons, alcool déshydrogénase.

INTRODUCTION

L'étude qualitative de l'activité alcool déshydrogénase (A.D.H.) chez les Pleurotes des Ombellifères ■ mis en évidence deux types de bandes : bandes précoces et bandes de maturité pouvant constituer une base de marqueurs enzy-

1. Ce travail fait partie d'une thèse de 3ème cycle préparée au Laboratoire du G.P.D.P., C.N.R.S. à Gif s/ Yvette et au Laboratoire de Cryptogamie, M.N.H.N. à Paris, soutenue le 16 Février 1984 à l'Université Pierre et Marie Curie, Paris 6.

* Université Marien Ngouabi, B.P. 69, Brazzaville, République populaire du Congo.

CRYPTOGAMIE, MYCOLOGIE (*Cryptogamie, Mycol.*), TOME ■ (1985).

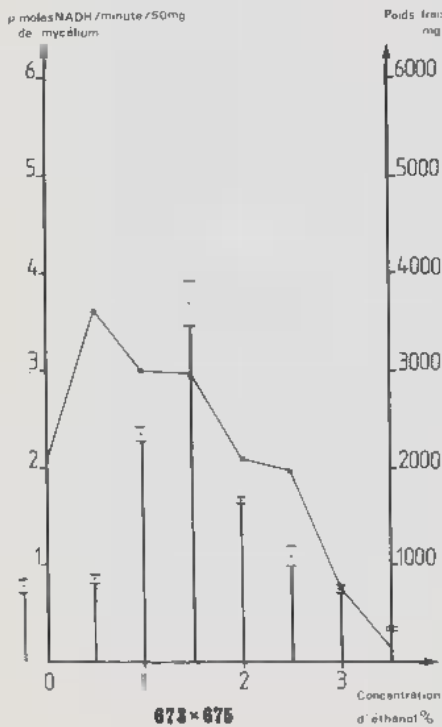
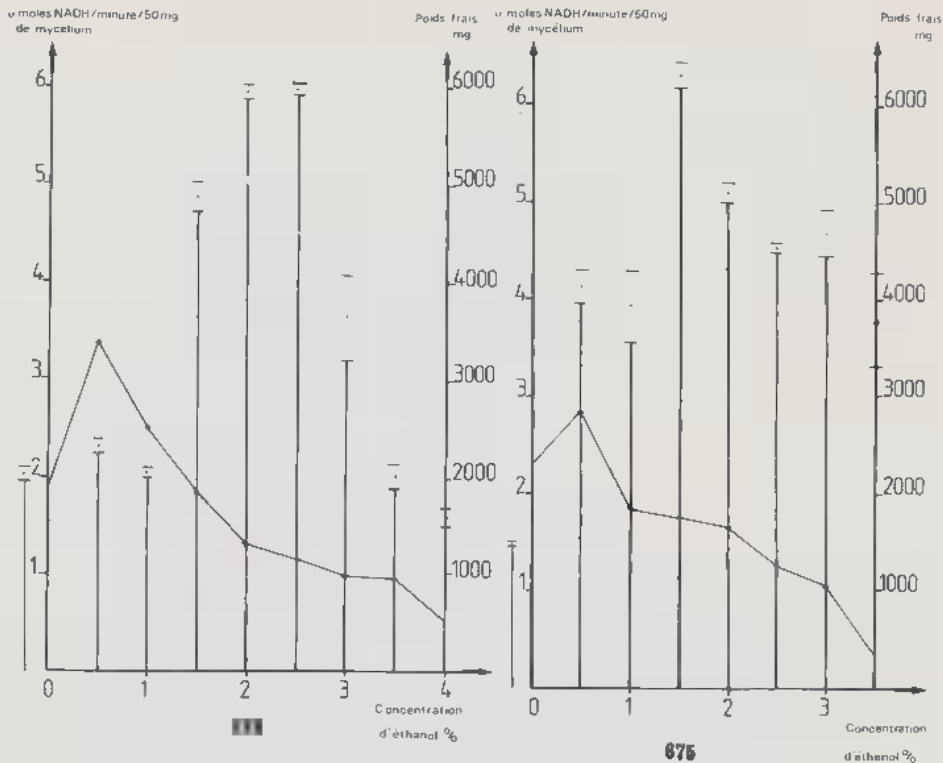


Fig. 1 à 3 : Effet de différentes concentrations d'éthanol dans le milieu de culture, après 2 semaines de croissance, sur l'activité A.D.H. (I) et sur la croissance mycélienne (—) de deux homokaryons : 673 (Fig. 1) et 675 (Fig. 2) et du dikaryon reconstitué : 673 x 675 (Fig. 3).

Pour l'activité A.D.H., les deux mesures expérimentales sont représentées par les tirets, le point exprimant leur moyenne.

Fig. 1 to 3 : Effect of different ethanol concentrations introduced in the cultural medium, after two weeks, on A.D.H. activity (I) and mycelial growth (—), for two homokaryons : 673 (Fig. 1) and 675 (Fig. 2) and the «restored» dikaryon : 673 x 675 (Fig. 3).

matiques pour les thalles végétatifs ou agrégés du *Pleurotus eryngii* (BALOUNGA, 1985). Nous étudions à présent l'effet éthanol sur l'activité A.D.H. et sur la croissance mycélienne. Pour cette analyse, différentes concentrations d'éthanol sont introduites dans le milieu de culture du mycélium de Pleurote. Après deux semaines de culture, l'effet éthanol sur l'activité A.D.H. du mycélium est suivie par les cinétiques enzymatiques et sur la croissance mycélienne, cet effet est évalué par le poids frais de mycélium recueilli. Nous avons également comparé l'évolution de l'activité A.D.H. et de la croissance mycélienne sur milieu témoin et sur milieu éthanol. Des essais ont encore été réalisés avec l'acétaldéhyde (BALOUNGA, 1984).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel

Pour ce travail, nous avons utilisé deux souches homocaryotiques issues d'un dicaryon *P. eryngii* récolté à Montrichard (bords du Cher, France) : l'homocaryon 675 exprime un comportement normal tandis que l'homocaryon 673 présente une croissance réduite. Nous avons également analysé le dicaryon reconstitué résultant de la confrontation 673 x 675.

Méthodes

Le milieu de culture de base pour le mycélium et la technique de préparation des extraits de protéines mycéliennes sont identiques à ceux utilisés dans nos précédents travaux (BALOUNGA, 1985).

L'adjonction d'éthanol au milieu de culture est réalisée dans des conditions stériles, avant l'ensemencement du mycélium.

Pour les cinétiques enzymatiques, l'activité A.D.H. des extraits est évaluée sur la base de la réaction dans le sens N.A.D. vers N.A.D.H., ou éthanol vers acétaldéhyde (RACKER, 1950) et l'augmentation de densité optique à 340 nm, liée à l'apparition du N.A.D.H., est suivie sur un spectrophotomètre (BECKMAN DU-8). Le milieu réactionnel de la cinétique enzymatique est le suivant : tampon pyrophosphate de sodium (0,1M pH 9 contenant 1,67 mg glycine/ml) : 2,5 ml; hydrazine carboxamide (250 mg/ml, pH 6,5) : 0,1 ml; éthanol 96 % : 0,2 ml; nicotinamide adénine dinucléotide (20 mg/ml) : 0,2 ml; glutathione (90 mg/ml) : 0,01 ml; extrait : 0,4 ml. L'activité est exprimée en μ moles de N.A.D.H. apparues par minutes, pour 50 mg de mycélium.

RÉSULTATS

1) Effet éthanol sur l'activité A.D.H. et sur la croissance mycélienne.

Pour étudier l'effet éthanol, nous avons introduit, dans le milieu de culture, des volumes d'éthanol correspondant à des concentrations de 0,5 %, 1 %, 1,5 %, 2 %, 2,5 %, 3 %, 3,5 % et 4 % et les résultats des analyses après deux semaines

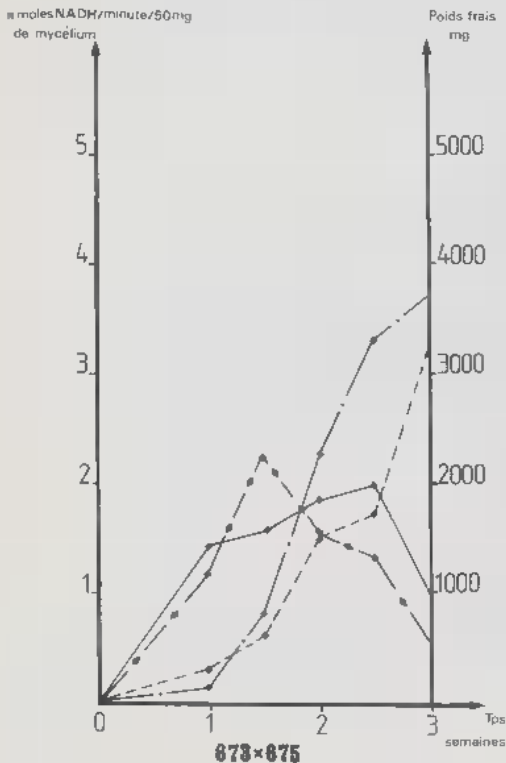
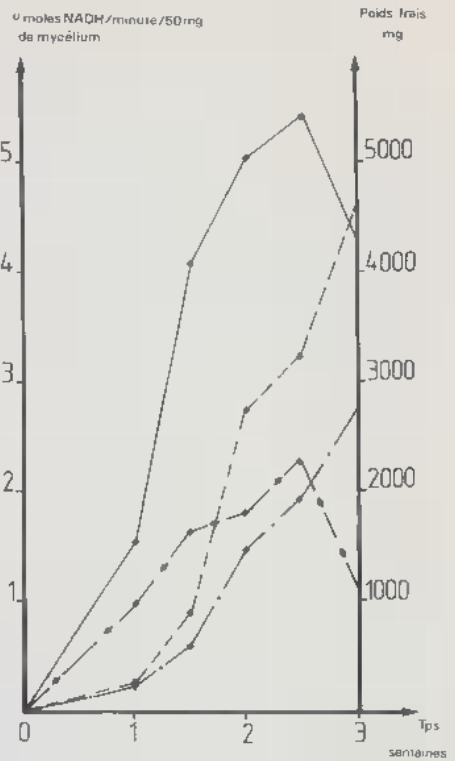
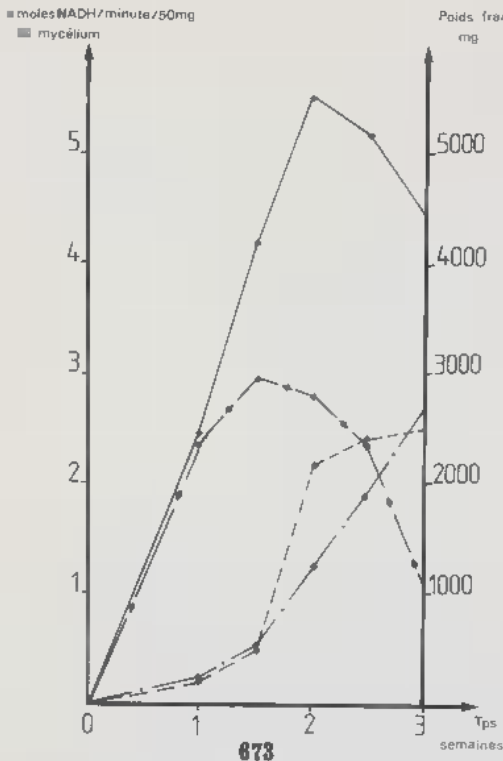


Fig. 4 à 6 : Évolution de l'activité A.D.H. et de la croissance mycélienne en fonction du temps, pour deux homocaryons : 673 (Fig. 4) et 675 (Fig. 5) et pour le dikaryon reconstitué 673 x 675 (Fig. 6).

— sur milieu témoin (—◆—◆— : activité enzymatique; --- : croissance mycélienne).
— sur milieu éthanol 2 % (— : activité enzymatique; --- : croissance mycélienne).

Fig. 4 to 6 : Evolution of A.D.H. activity and mycelial growth in course of time, for two homokaryons : 673 (Fig. 4) and 675 (Fig. 5) and the «restored» dikaryon 673 x 675 (Fig. 6).

— on reference medium (—◆—◆— : enzymatic activity; --- : mycelial growth).
— on 2% ethanol medium (— : enzymatic activity; --- : mycelial growth).

de croissance sont reportés, pour les différentes souches, sur les Figures 1 à 3.

En ce qui concerne la croissance mycélienne, les deux homocaryons réagissent de manière comparable : maximum de croissance pour 0,5 % d'éthanol, puis inhibition progressive à mesure que la concentration d'éthanol croît. La seule différence notable est, à 1 %, une légère stimulation de l'homocaryon 673 alors que 675, apparemment plus sensible, est déjà inhibé. Malgré ces différences de sensibilité, les deux homocaryons sont capables d'utiliser l'éthanol, favorable à leur croissance à de faibles doses, c'est-à-dire inférieures ou égales à 1 %.

Par contre, les deux homocaryons expriment des comportements distincts au niveau de leurs activités A.D.H. :

— L'homocaryon 673 semble réagir relativement peu : aux concentrations stimulantes pour sa croissance, il conserve une intensité d'activité égale à celle qu'il exprime spontanément. Cette activité s'accroît notablement de 1,5 à 2,5 % alors que sa croissance commence à être inhibée. Au delà de 2,5 % d'éthanol, poids frais et activité A.D.H. s'effondrent progressivement.

— L'homocaryon 675, au contraire, réagit par une forte augmentation de son activité à toutes les concentrations étudiées, de 0,5 % où il extériorise une stimulation de croissance, jusqu'à 3,5 % où sa croissance est pourtant inhibée. Cette forte augmentation d'activité A.D.H. observée en présence d'éthanol et peu dépendante de l'inhibition de croissance semble mieux correspondre à une réaction de détoxification que ne le suggère le comportement de l'homocaryon 673.

Le dicaryon 673 x 675 montre une croissance stimulée jusqu'à une concentration de 2 % d'éthanol, extériorisant là une potentialité propre par rapport à ses homocaryons constitutifs, inhibés au delà d'une concentration de 1 % d'éthanol. L'activité A.D.H. n'est pas modifiée à 0,5 % et montre à 1,5 % un maximum beaucoup plus faible que ceux des homocaryons, ce qui n'est pas l'indice d'une intense activité de détoxification. A toutes les autres concentrations d'éthanol, l'activité A.D.H. semble proportionnelle au poids frais, ce qui suggère au contraire l'hypothèse d'une stimulation d'activité essentiellement d'origine trophique.

2) Évolution de l'activité A.D.H. et de la croissance mycélienne en fonction du temps.

Cette étude permet de suivre la croissance mycélienne et l'activité A.D.H. sur milieu témoin (sans éthanol) et sur milieu éthanol 2 %, concentration à laquelle les deux homocaryons sont inhibés alors que le dicaryon montre encore une croissance légèrement stimulée. L'activité A.D.H. et le poids frais de mycélium obtenus ont été mesurés après 1, 1 1/2, 2, 2 1/2 et 3 semaines de culture et les résultats des analyses sont reportés, pour les différentes souches sur les Figures 4 à 6.

Sur le milieu témoin, les deux homocaryons présentent des vitesses de croissance comparables, sur la base des pentes au cours de la phase exponentielle. Cependant, l'homocaryon 673, à croissance limitée, exprime un « vieillissement »

plus rapide, caractérisé par une entrée plus précoce en phase stationnaire (le pic d'activité A.D.H. est d'ailleurs également un peu plus précoce). Le dicaryon 673 x 675 présente une pente de phase exponentielle légèrement plus faible, mais n'est pas affecté par le facteur de «vieillesse» précoce propre à l'homocaryon 673. D'une manière générale, le comportement du dicaryon se rapproche plutôt de celui de 673 pour l'activité A.D.H. et de celui de 675 pour la croissance. Ceci permet de penser que l'évolution de l'activité A.D.H. et la croissance, phénomènes concomitants, puisse être génétiquement dissociables.

Sur milieu éthanol, on constate que :

- la présence d'éthanol constitue un facteur limitant pour la croissance des deux homocaryons, avec réduction de la pente de la phase exponentielle et retard de l'entrée en phase stationnaire pour 673. La croissance du dicaryon est, au contraire, stimulée.

- la présence d'éthanol accroît l'activité A.D.H. chez les deux homocaryons : par prolongation de la durée de la production chez 673, et par augmentation de production sans modification de la durée chez 675. Le dicaryon, quant à lui, ne présente pas de modification majeure, ni au niveau de l'activité maximale enregistrée, ni au niveau de la vitesse de production initiale. Il semble maintenir seulement plus longtemps une intensité d'activité A.D.H. assez proche de celle du pic qu'il extériorise spontanément sur le milieu témoin.

Dans tous les cas, que le mycélium soit homocaryotique ou dicaryotique, et qu'il s'agisse du milieu témoin ou du milieu éthanol, le maximum de l'activité A.D.H. précède la fin de la croissance exponentielle. Cette observation expérimentale permet de suggérer que le déclin de l'activité A.D.H. ne soit pas le résultat de modifications métaboliques consécutives au passage à la phase stationnaire, mais qu'il soit plutôt associé à un âge physiologique du mycélium encore en phase exponentielle. Cette hypothèse coïncide avec les résultats de l'analyse qualitative (BALOUNGA, 1985), mettant en évidence l'apparition de «bandes de maturité» chez le dicaryon, à âge constant.

3) Effet acétaldéhyde sur l'activité A.D.H. et sur la croissance mycélienne.

Toutes les tentatives de culture en présence d'acétaldéhyde s'étant avérées négatives, même aux concentrations de 0,25 % et 0,5 %, l'acétaldéhyde semble constituer un véritable poison pour le mycélium des souches homocaryotiques ou dicaryotiques.

La présence de l'acétaldéhyde dans le milieu de culture étant incompatible avec la survie du champignon, on peut penser qu'il en soit de même d'une accumulation d'acétaldéhyde dans le mycélium. Son élimination s'avère donc obligatoire. Un tel résultat ne nous paraît pas surprenant puisque chez *Drosophila melanogaster*, la concentration létale de l'acétaldéhyde se situe aux alentours de 0,5 % (DAVID, 1977). D'après DICKINSON (1970), dans l'organisme animal, l'acétaldéhyde doit être éliminée par une réaction couplée qui la transforme en

acétate, non toxique et utilisable comme source énergétique, grâce à l'aldéhyde oxydase.

CONCLUSIONS

Notre travail a permis de mettre en évidence deux caractéristiques des activités A.D.H. au cours du cycle végétatif du *Pleurotus eryngii*, que son thalle soit homocaryotique ou dicaryotique :

— l'expression de l'activité A.D.H. n'est pas uniforme dans le temps, elle croît puis décroît avec l'âge du mycélium, pour disparaître à l'âge de quatre semaines.

— le pic d'activité A.D.H. maximale se situe toujours avant la fin de la phase de croissance exponentielle, y compris chez l'homocaryon 673 dont l'entrée précoce en phase stationnaire est assortie d'un pic précoce d'activité A.D.H.

Une précédente étude (BALOUNGA, 1985) montre que les homocaryons présentent un polymorphisme enzymatique qui s'extériorise, avec les techniques utilisées, par l'expression de trois bandes d'isoenzymes. Toutefois, ce polymorphisme n'est assorti d'aucune variabilité. L'évolution de l'activité A.D.H. au cours de la croissance homocaryotique sur milieu témoin est donc purement quantitative.

La comparaison des comportements de deux homocaryons, l'un à développement «normal» (675), l'autre à développement «réduit» (673) montre que, dans les deux cas, les homocaryons sont capables d'utiliser l'éthanol à de faibles doses (0,5 à 1 %) mais que des concentrations élevées réduisent la vitesse de croissance du premier, agissant alors à la manière d'un facteur limitant, mais masquent les caractéristiques de «développement réduit» du second. On aboutit alors à des courbes de croissance pratiquement identiques.

— l'homocaryon 673, dont l'activité A.D.H. reste stable aux concentrations trophiques (0,5 à 1 %), ne semble guère répondre par une stimulation d'activité A.D.H. aux concentrations inhibitrices de la croissance : les variations décelées semblent plutôt correspondre à l'allongement de la durée de production consécutive à la non-expression du caractère de développement «réduit».

— l'homocaryon 675, au contraire, exprime une stimulation d'activité A.D.H. dès les concentrations trophiques et amplifie cette réaction aux concentrations inhibitrices aussi longtemps qu'elles sont compatibles avec la croissance.

Tout se passe donc comme si le premier n'exprimait en toutes circonstances qu'une activité spontanée alors que le second était capable d'exprimer, en plus, une activité inductible par la présence d'éthanol. En outre, si l'on considère que le comportement exprimé par 675 peut représenter une réaction de détoxification, la comparaison des cinétiques de croissance des deux homocaryons sur milieu témoin et sur milieu à 2 % d'éthanol laisse penser que cette détoxification est un processus peu efficace, puisqu'elle s'accompagne d'une réduction importante de poids frais final alors que pour 673, la non-expression du développe-

ment réduit maintient inchangé ce poids final. En d'autres termes, la détoxification exprimée par 675 représenterait peut-être moins un processus destiné à réduire l'inhibition qu'une simple exacerbation d'une activité inductible en présence d'éthanol. Ce point nécessiterait l'étude, parmi la descendance homocaryotique du dicaryon 673 x 675, d'éventuels recombinants à développement «réduit» et activité «inductible» d'une part, et à développement «normal» sans activité «inductible» d'autre part.

Le dicaryon 673 x 675 exprime, pour sa part, un comportement fondamentalement différent de ceux de ses deux homocaryons constitutifs. Dans nos deux essais, sa croissance est stimulée et non inhibée par la présence d'éthanol. Il utilise activement l'éthanol jusqu'à un peu plus de 2 %, avec augmentation de sa vitesse de croissance et une entrée semble-t-il un peu plus précoce en phase stationnaire. La stimulation modérée de son activité A.D.H. jusqu'à une concentration d'éthanol un peu supérieure à 2 % dans les premiers essais ou l'étalement du pic dans les seconds essais représentent simplement le développement ou le maintien d'une forte activité A.D.H. destiné à métaboliser l'éthanol dans le milieu. Il ne détoxifie donc pas plus que l'homocaryon 673, mais montre une bien meilleure résistance à l'éthanol et l'utilise jusqu'à des concentrations beaucoup plus élevées que ne le font les homocaryons.

Cette différence de comportement du mycélium dicaryotique par rapport aux mycéliums homocaryotiques vient également à l'appui des résultats obtenus par l'étude qualitative menée après électrophorèse et révélation de l'alcool déshydrogénase, par laquelle nous avons pu mettre en évidence l'apparition de «bandes de maturité» chez les dicaryons, non exprimées au niveau des homocaryons.

BIBLIOGRAPHIE

- BALOUNGA P., 1984 — Étude de l'activité alcool déshydrogénase chez les Pleurotes des Ombellifères. Thèse 3ème cycle, Paris 6, 82 p.
- BALOUNGA P., 1985 — Étude de l'activité alcool déshydrogénase chez les Pleurotes des Ombellifères. I - Étude qualitative. *Cryptogamie, Mycol.* 6 : 153-166.
- DAVID J., 1977 — Signification d'un polymorphisme enzymatique : la déshydrogénase alcoolique chez *Drosophila melanogaster*. *Ann. Biol.* 16 : 451-472.
- DICKINSON W.J., 1970 — The genetics of aldehyde oxidase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 66 : 487-496.
- RACKER E., 1950 — Crystalline ADH from baker's yeast. *J. Biol. Chem.* 184 : 313-319.